表达β-珠蛋白基因的安全性慢病毒载体的优化*

韩亚丽[1] 杨冠恒[1,2] 陈雁雯[1] 龚秀丽[1] 张敬之[1,2**]

（1 上海交通大学附属儿童医院 上海市儿童医院 上海交通大学医学遗传研究所 上海 200040）

（2 卫生部医学胚胎与分子生物学重点实验室、上海市胚胎与生殖工程重点实验室 200040）

摘要 目的：慢病毒载体(Lentiviral vector ，LVV)是一种有效的基因治疗导入系统。本研究拟用已研发的携带人的β-珠蛋白基因自删除慢病毒载体，优化其表达有效性和提高其病毒颗粒数。方法：首先，比较三款不同的启动子预测软件的分析结果，分别构建三种不同长度启动子的表达β-珠蛋白基因（*β-globin*）的LVV，并对其II号内含子进行部分删减；用经优化的LVV转导β-地中海贫血（β-地贫）的小鼠诱导性多能性干细胞（induced pluripotent stem cells，iPSC）后，进而用此iPSC制备嵌合体小鼠模型；经RT-PCR、血涂片瑞氏吉姆萨染色等观察分析其功能性代偿的潜能。研究结果：经优化后的自删除慢病毒载体病毒对其病毒颗粒数的滴度影响不大（2.3×10^{11}PLs/ml），可在嵌合体小鼠模型体内检测到正常人β-珠蛋白基因的功能性表达。结论：优化了表达人β-珠蛋白基因的自删除LVV。

关键词 β-地中海贫血 自删除慢病毒载体 优化 基因治疗

The Optimization of self-deleting Lentiviral vector carrying human *β-globin* gene and promoter

HAN Ya-li[1] YANG Guang-heng[1,2] CHEN Yanwen[1] GONG Xiu-li[1] ZHANG Jing-zhi[1,2]

(1 Shanghai Institute of Medical Genetics, Children's Hospital of Shanghai, Children's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, 20040, China)

(2 Key Laboratory of Embryo Molecular Biology, Ministry of Health, Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, 20040, China)

Abstract Objective: Optimization of previous developed self-deleting lentiviral vector carrying human *β-globin* gene and promoter in terms of preparation titles and transgene

* 安全性慢病毒载体介导的β-地中海贫血基因治疗研究，国家自然科学基金面上项目，81570172

** 通讯作者，电子信箱：jzhang38@hotmail.com

expressing efficacy. Methods: Based on the comparison of the predictions of three on line promoter prediction softwares, three self-deleting lentiviral vectors carrying three different lengths of β-*globin* promoters with gene were constructed. The optimization was carried out in terms of preparation titles and transgene expressing efficacy. The optimized LVV was used to transduce murine -thalassemia iPSC, and resulted cells were used to generate chimeric mice. RT-PCR and Wright Giemsa staining were then carried out on the mice blood. Results: The viral particles prepared by the optimized LVV principally have no difference comparing with their parental virus, FUGW. The functional expression of normal spliced human β-*globin* gene was detected in the chimeric mice. And the morphologically normal of erythrocytes was observed. Conclusion: An optimized self-deletion lentiviral vector, FCB-P265, was made.

Key Word β-thalassemia self-deleted lentivirus vector optimization gene therapy

β-地中海贫血（简称β-地贫）是一种遗传性血液病[1,2]。近年来，基因治疗作为一种有效的疾病治疗手段而倍受关注[3]。慢病毒载体(Lentiviral vector，LVV）是一种有效的基因导入系统，自 2000 年 LVV 首次被成功地用于β-地贫模型小鼠水平上的基因治疗以来，它被越来越多地应用于β-地贫的基因治疗的研究[4,5]。2010 年，在一例运用 LVV 临床治疗β-地贫的患儿血液内发现了优势克隆的形成[6]。LVV 在用于β-地贫基因治疗中的安全性隐患始终受到高度关注[7,8]。因此，对其安全性改进优化仍很有必要。

2013 年，利用 *cre* 酶可特异性识别两个同向的 *loxp* 位点，并介导 *loxp* 位点之间的基因删除这一原理，我们在 LVV 的删减 U3（ΔU3）区中先后插入了 *loxp* 序列位点及人β-珠蛋白基因，并在此 LVV 中引入了 *cre* 基因,构建了表达β-珠蛋白基因的自删除型 LVV（FCB）。该 FCB 在慢病毒包装过程中，经逆转录复制，在其两端形成完全相同的两个携带β-珠蛋白基因及 *loxp* 序列的 LTR，在整合入染色体后，*cre* 基因会表达 *cre* 酶并特异性识别分别位于 LTR 的两个同向 *loxp* 位点，进而介导两个 *loxp* 位点之间发生删除，从而自删除 LVV 的基本骨架，而只留下一个包含人β-珠蛋白基因盒的 LTR（图 1）[9]。它基本消除了产生重组型 LV 活病毒的可能性，从而大大地提高了其生物安全性。但在 FCB 的ΔU3 区域内插入长达 3.2kb 的β-*globin* 基因，会降低其包装病毒的滴度[9]。因此，需对 FCB

进行插入基因长度的优化以提高其表达效果及病毒颗粒生物滴度，进而提升其应用的潜能。

针对上述问题，通过构建一系列 FCB 载体，对 FCB 上的ΔU3 的 *β -globin* 的启动子进行优化并且对其Ⅱ号内含子进行部分删减。在此基础上，选择较优的 FCB-P265 慢病毒载体假病毒转导至源自地贫小鼠的诱导性多能干细胞（induced pluripotent stem cells，iPSC），并用此细胞制备嵌合体模型小鼠。实验证实，经优化后的载体 FCB-P265 制备的病毒颗粒数较高，且可有效感染地贫小鼠的 iPSC，并在用此细胞制备的嵌合体小鼠血液内进行有效表达，且未发现异形红细胞。

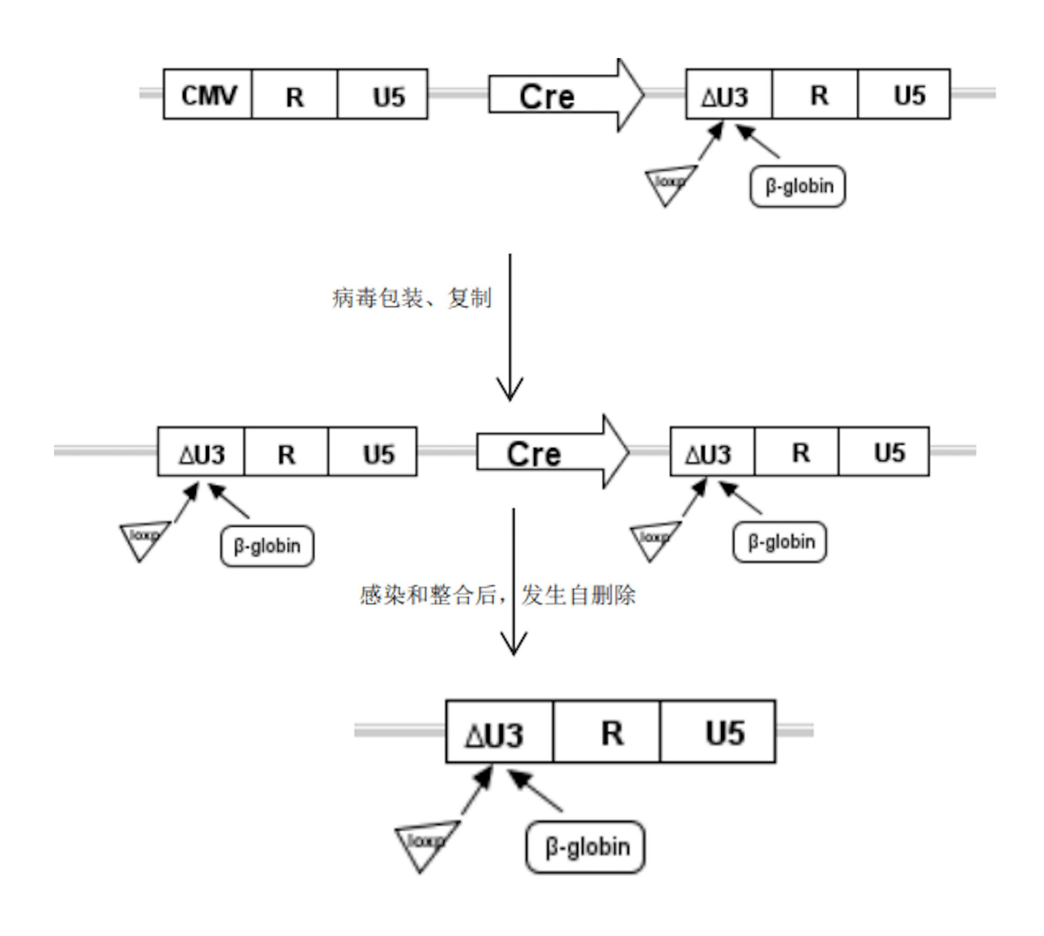


图 1 自删除慢病毒载体的工作原理

Fig. 1 Schematic Presentation the mechanism of the self-deleted lentiviral vector

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞　T-easy 载体购自 Promega 公司、ECOS 感受态细胞购自益生生技、Stable3 感受态细胞购自 Transgene、K562 细胞和小鼠地中海贫血 iPS 细胞、FUGW 慢病毒载体质粒系统由上海医学遗传研究所保存、FCB 质粒由我们先前构建。

1.1.2 工具酶与试剂　1640 基础培养基、DMEM 基础培养基、胎牛血清均购自 Gibco BRL 公司，Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司，高纯度小量中提质粒提取试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司，Solution I 连接酶、TRIZOL、 PrimeSTAR®GXL DNA Polymerase、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR Premix Ex Taq II、Clontech Lenti-X p24Rapid Titer Kit 均购自 TAKARA 公司,所有限制性内切酶均购自 NEB（New England Bio）公司，ClonExpress® II One Step Cloning Kit 购自诺维赞公司、电转仪购自美国 BioRad 公司。

1.1.3 引物序列与合成　所用引物均使用 Primer 5 软件设计后，由上海捷瑞公司合成。具体引物及探针序列如下表（表 1）。

表 1　引物列表

Table 1　List of Primers

Primer	Primer-sequence（5’-3’）
Promoter-U3-F	ATCGATACCGTCGACCTCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCA
P265-U3-R	ATTTGGAATCACAGCATCGTCGACCGTGTAACAAGCGGGT
P675-U3-R	CTGTGCATTAGTTACATCGTCGACCGTGTAACAAGCGGGT
P265-U3-F	TACACGGTCGACGATGCTGTGATTCCAAATATTACGTAAA
P675-U3-F	TACACGGTCGACGATACTAATGCACAGAGCACATTGATTT
BsrgI-IN-R	ATTTGGTCAATATGTGTACAACCCTGTTACTTATCCCCTTCCTAT
PmeI-LTR-R	CTAGAAGGCACAGTCGAGGC]
SY-F	TGTTCCCTAAGTCCAACTACTAAAC
SY-R	TCTCGACGCAGCGAGTAGTGAAGAG
SY-actin-F	GGACTTCGAGCAGGAGATGG
SY-actin-R	GCACCGTGTTGGCGTAGAGG

Globin-QF	CCCAGAGGTTCTTTGAGT
SLTR2-R	AGGTTCTCGAATCAAGTCGGTT
MG-F	CTCGGTGCCTTTAGTGATGG
MG-R	AGCCTGCACTGGTGGGGTGAA

1.2 方法

1.2.1 *β-globin* 基因启动子长度预测　分别用 Neural Network Promoter Prediction（NNPP）、Promoter 2.0 Prediction Server、Promoter scan 三款不同的在线启动子预测软件对人 *β-globin* 基因启动子进行比较分析和预测。

1.2.2 三种不同启动子长度的 FCB 的构建

FCB-P1700 载体的构建　用 *Pac* Ⅰ、*BspE* Ⅰ分别对质粒 FUGW 和 FCB 进行双酶切，回收得到 FUGW 骨架和 FCB 片段用 Solution Ⅰ连接酶连接后得到载体 FCB-P1700。

FCB-P675 载体的构建　以载体 FCB-P1700 为模板，用引物 Promoter-U3-F/P675-U3-R 进行 PCR 扩增得到片段 loxP-U3，用引物 P675-U3-F/BsrgI-IN-R 进行 PCR 扩增得到片段 675P-globin，以 Promoter-U3-F/BsrgI-IN-R 为引物通过融合 PCR 将两片段 loxP-U3、675P-globin 进行连接得到片段 loxP-U3-675PG。用 *Xho* Ⅰ、*BsrG* Ⅰ对质粒 FCB-1700P 进行双酶切得到骨架 F675P。在此基础上，用 One Step Cloning Kit 将骨架 F675P 和片段 loxP-U3-675PG 连接后得到载体 FCB-P675。

FCB-P265 载体的构建　以载体 FCB-P1700 为模版，用引物 Promoter-U3-F/P265-U3-R 进行 PCR 扩增得到片段 loxP-U3，用引物 P265-U3-F/*Bsr*GI-IN-R 进行 PCR 扩增得到片段 265P-globin，以 Promoter-U3-F/*Bsr*GI-IN-R 为引物通过融合 PCR 将两片段 loxP-U3、265P-globin 进行连接得到片段 loxP-U3-265PG。用 *Xho* Ⅰ、*BsrG* Ⅰ对质粒 FCB-1700P 进行双酶切得到骨架 F265P。用 One Step Cloning Kit 将骨架 F1700P 和片段 loxP-U3-625PG 连接后得到载体 FCB-P265。

以上连接产物均经转化至 Stable3 大肠杆菌感受态中，转移到含有氨苄抗性的 LB 琼脂培养板上 37℃培养 15 小时后，挑取单克隆，经提取质粒，酶切鉴定后，酶切大小正确的克隆送出测序。

1.2.3 三种不同拟病毒载体的构建　分别以 FCB-P1700、FCB-P675、FCB-P265 为模版，用引物 Promoter-U3-F/进行 PCR 扩增得到片段 loxP-1700P、loxP-675P、loxP-265P，用 Solution I 分别将其与 T 载连接，24 小时后将连接产物转化至 ECOS 大肠杆菌感受态 DH5α 中，转移到有氨苄抗性的 LB 琼脂培养板上，37℃培养 15 小时后，挑取单克隆，提取质粒酶切鉴定，酶切大小正确的克隆送出测序。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测不同拟病毒载体在 K562 细胞中 β-*globin* 基因的表达效果

将 K562 细胞以 1×10^6 每孔的密度铺到 6 孔板中，第二天用 BioRad 电转仪将三种拟病毒载体以相同的分子数转入 K562 细胞，培养 48 小时后加入含 1.5% DMSO 1640 完全培养基进行诱导，诱导培养 48 小时后收集细胞，Trizol 法提取 RNA,用 TAKARA 的 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 去除基因组 DNA 后进行逆转录合成 cDNA。以 beta-actin 作为内参，利用 TAKARA 的 SYBR 进行定量 PCR 反应，检测各拟病毒载体的表达效果。

1.2.5 ELISA 检测慢病毒载体包装病毒滴度　所构慢病毒载体 FCB-P675、FCB-P265 及对照载体 FUGW 进行慢病毒包装，慢病毒包装服务由上海吉满生物科技有限公司提供。对包装好的慢病毒载体，用 Clontech Lenti-X p24 Rapid Titer Kit 进行慢病毒载体颗粒数检测。

1.2.6 慢病毒载体感染 iPS 细胞及其整合情况检测　将 iPS 细胞复苏培养后，用包装好的慢病毒 FCB-P265 假病毒进行感染，随后挑取单克隆进行细胞建系。对各细胞系分别抽提细胞 DNA，PCR 鉴定慢病毒载体是否成功整合至 iPS 细胞基因组。

1.2.7 用 FCB 转导的地贫 iPS 细胞制备转基因嵌合体小鼠　地贫 iPS 细胞经转导入携带β-珠蛋白基因的自删除慢病毒载体后，被显微注射方式注入β-地贫小鼠的 E3.5 囊胚中，每个囊胚注 15 个 iPS 细胞。将注射胚移植入受体小鼠子宫中，约孵育 17 天后，嵌合体小鼠出生。6 周龄后被采集外周血，在 mRNA 水平上分析外源基因的表达功能。

1.2.8 用嵌合体模型分析外源基因的表达情况　采集 6 周龄嵌合体小鼠外周血，Trizol 法提取 RNA,用 TAKARA 的 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 去除基因组 DNA 后进行逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板用引物 MG-F/MG-R PCR 扩增分析外源基因的表达功能。

1.2.9 用嵌合体模型分析外源基因的表达对红细胞质量的影响作用　　采集嵌合体小鼠新鲜外周血后制备血涂片，用 BASO 的瑞氏-吉姆萨染色液进行染色，晾干后于显微镜下观察。

1.2.10 PCR 扩增体系

PCR 扩增目的片段(25μl):PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase 5 μl、5×PrimeSTAR buffer 5μl、上下游引物各 1μl、模板 2μl、dNTP 2μl;

扩增条件：95℃ 5min（循环数 1），95℃ 45s，58℃ 45s，72℃延伸（延伸速度 1KB/min）（循环数 30），72 ℃ 10min（循环数 1）。

RT-PCR 检测拟病毒载体 globin 基因表达情况(20μl 体系):SYBR Premix Ex Taq II　(2×）10μl,上下游引物（10μmol•L-1）各 0.8μl，　ROX Reference Dye（50×）0.4μl

扩增条件：stage1 95℃预变性 30s(循环数 1)，stage 2，95℃ 5s，60℃ 34 s（循环数 40）。

1.2.11 统计学分析 采用 Graphpad 统计软件对实验数据进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2. 实验结果

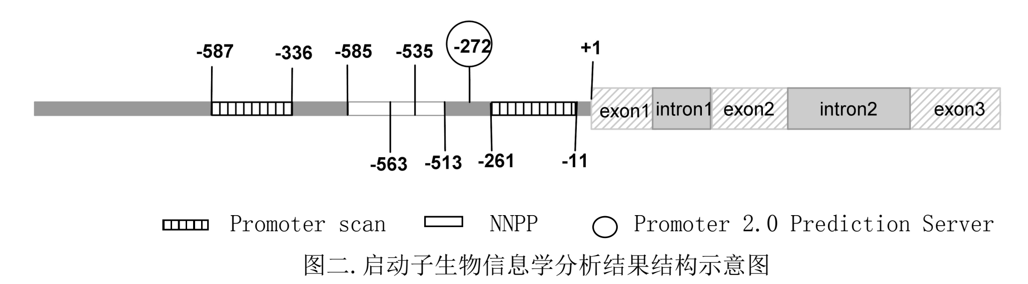
2.1 β-*globin* 基因启动子软件预测结果

β-*globin* 基因启动子生物信息学分析结果如表 2 及图 2 所示，不同的预测软件结果均表明 β-*globin* 基因的启动子多集中在编码区上游有-260bp 至-700bp 范围内。

表 2. 不同的启动子预测软件对人 β-*globin* 基因启动子的预测结果

Table 2. Different Bioinformatic prediction of human *β-globin* promoter

在线启动子生物信息学分析工具	启动子预测结果
Promoter 2.0 Prediction Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/)	-272
Neural Network Promoter Prediction (NNPP)	-585—（-535)
(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html　)	-563—（-513)
Promoter scan	-587—（-336)
(https://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/)	-261—（-11)



图二. 启动子生物信息学分析结果结构示意图

Fig.2 Bioinformatic prediction of human *β-globin* promoter

2.2 三种不同长度启动子的自删除慢病毒载体的构建

将 *cre*、*loxP*、*β-globin* 基因片段分别插入到自删除慢病毒载体的ΔU3 区中，从而构建出自删除慢病毒 FCB 载体，结构如图 3 所示，将酶切大小正确者送出测序，测序结果正确。

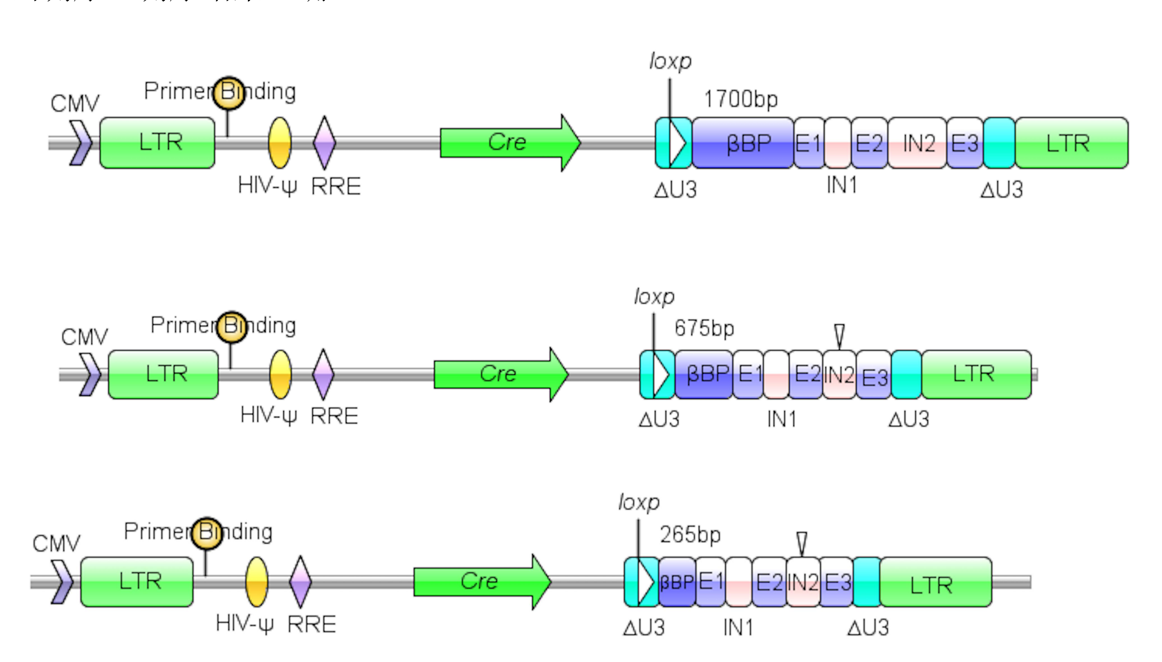


图 3. 三种慢病毒载体结构图，依次为 FCB-P1700、FCB-P675、 FCB-P265（βBP: β-globin 基因启动子；E: 外显子；IN: 内含子；▽： II 号内含子(IVS2)删除 372bp）。

Fig.3 Schematic presentations of three different lengths of β-globin promoter driven β-globin expressing lentiviral vector, FCB-P1700、FCB-P675、 FCB-P265(βBP: β-globin promoter ; E:Exon; IN:Intron ; with a 372-bp deletion in IVS2).

2.3 三种不同启动子长度的拟病毒载体的构建

模拟慢病毒载体在染色体上发生自删除后的情况，将融合 PCR 连接好的片段连接到 T 载体中，构建三种不同的拟病毒载体图谱如图所示（图 4），经挑取菌落进行酶切验证，将酶切大小正确者送出测序，测序结果与预期一致。

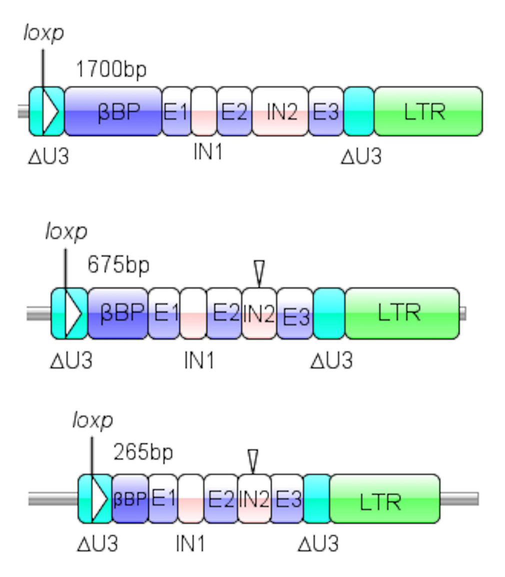


图 4. 三种不同的拟病毒载体的结构图，自上而下依次为 pro-1700、 pro-675、 pro-265（P:β-globin 基因启动子；E:外显子；IN:内含子；▽：II 号内含子删除 372bp）。

Fig.4 Schematic presentations of the three pro-LVV, named as pro-1700、 pro-675、 pro-265, after self-deletion(βBP: β-globin promoter；E:Exon；IN:Intron, ▽: with a 372-bp deletion in IVS2).

2.4 检测不同的拟病毒载体在 K562 细胞中的β-globin 表达效果

比较三种不同长度的启动子表达目的基因的效果。与没有转染拟病毒载体的 K562 细胞相比，三种拟病毒载体 *β-globin* 基因的表达效果分别为 pro-675< pro-1700<pro-265（图 5）。其中，启动子长度为 265 bp 且内含子做了部分删减的拟病毒载体 pro-265 的 *β-globin* 表达效果最好，为空白 K562 细胞的 24 倍。启动子长度为 675bp 且内含子做了部分删减的拟病毒载体 pro-675 的表达量最低，仅为空白 K562 细胞的 8 倍。

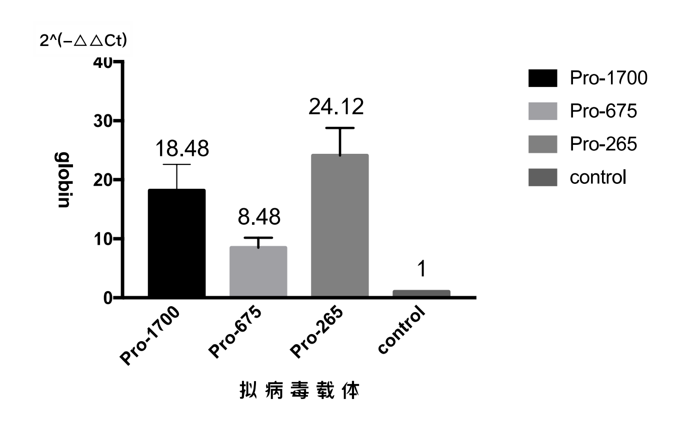


图 5. 不同的拟病毒载体表达β-globin 基因效果比较（n=3, *P*=0.00001<0.05）

Fig.5 The comparison of the expression among the three pro-LVV vectors after transfection（n=3, P=0.00001<0.05）

2.5 不同启动子长度的自删除慢病毒载体包装病毒颗粒数比较

在此基础上，将 FCB-P675、FCB-P265 包装成慢病毒载体假病毒与它们的原始慢病毒载体 FUGW 相比，其病毒颗粒数 FCB-P675< FCB-P265 <FUGW（图 6），但无显著性差异（n=3，*P*=0.18>0.05），说明所构建的慢病毒载体，对其病毒颗粒数影响不大。



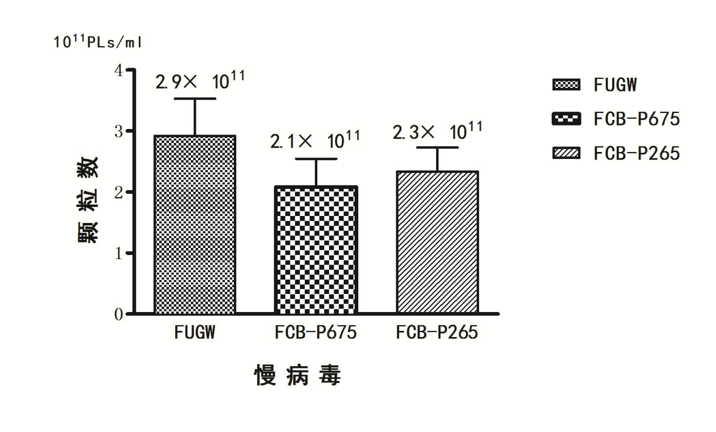


图 6. 不同启动子长度的自删除慢病毒载体包装病毒颗粒数比较（N=3, P>0.05）

Fig.6 The comparison of the viral particles produced by above pseudo viruses.n=3, P>0.05）

2.6 FCB-P265 慢病毒感染β-地贫 iPS 细胞

用 FCB-P265 慢病毒载体病毒感染小鼠β-地贫 iPS 细胞，挑取单克隆扩增培养后，分别进行 PCR 扩增鉴定，挑取的 12 个 iPS 克隆细胞中，其中一个克隆被成功地整合入了慢病毒载体病毒(图 7)，此转基因细胞系被用于制备嵌合体小鼠。

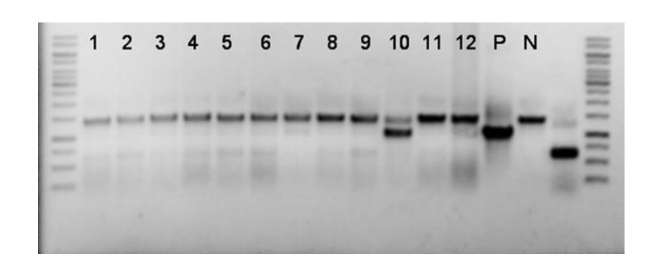


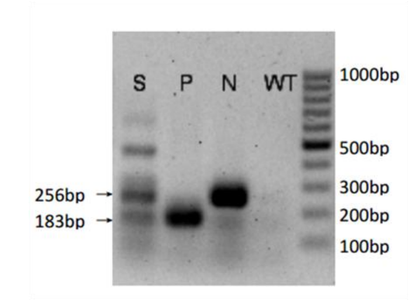
图 7. FCB-P265 慢病毒成功感染并整合入β-地贫 iPS 细胞。N：阴性对照；P：阳性对照；1-12 号为所挑取克隆，其中 10 号为阳性克隆。

Fig.7 Murine β-thalassaemia iPSC was successfully transduced with the FCB-P265. N: Negative control; P: Positive control. Number 1 to 12 are the iPSC clones, with which number 10 is the positive clone transduced with the FCB-265.

2.7 用转 *β-globin* 基因的β-地贫 iPS 细胞所制备的嵌合体模型小鼠，分析外源基因的表达及对红细胞质量的影响

RT-PCR 检测表明，在转 *β-globin* 基因的β-地贫 iPS 细胞的嵌合体模型小鼠血液内，不仅存在 $β^{654}$ 异常剪接（256bp）的表达，而且存在着与正常人血相同的 *β-globin* 基因正常剪接（183bp）的表达（图 8.a）。嵌合体血涂片观察表明，细胞呈典型的双凹圆盘状、正细胞正色素性红细胞形态，没有发现如 654 地贫小鼠血像中所含有的低色素性小细胞、破裂细胞、盔形细胞等异形细胞，形态学接近于 WT 小鼠（图 8.b）。

(a)



（b）

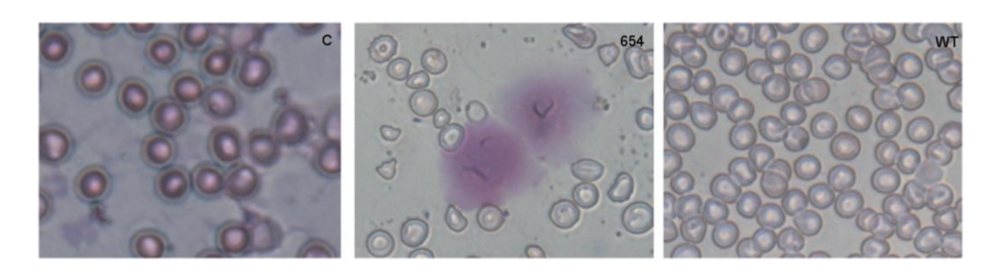


图 8.（a）RT-PCR 分析嵌合体模型中外源基因的表达. S:嵌合体模型小鼠;P:阳性对照，正常人外周血;N:阴性对照，β654 模型小鼠外周血;WT:野生型小鼠外周血.(b) 血涂片瑞氏-吉姆萨染色观察嵌合体模型中外源基因表达对红细胞质量的影响。 C:嵌合体模型小鼠; 654:β654 模型小鼠外周血; WT:野生型小鼠外周血。

Fig.8. (a) RT-PCR analysis the expression of the exogenous gene in the blood of the chimeric model mouse. S: the blood sample of the Chimeric model mouse. P：Positive control，normal human peripheral blood; N: Negative control，the peripheral blood sample from the β654 Model mouse；WT：the peripheral blood sample from the Wild-type mouse. (b) Blood smear and Wright Giemsa staining for observing the morphology of the red blood cells of the transgenic model mouse. C: the blood sample of the Chimeric model mouse. 654: the peripheral blood sample of the β654 model mouse；WT：the peripheral blood sample of the Wild-type mouse.

3. 讨论

早在 1997 年，有研究人员就提出，β-珠蛋白基因的高表达，需要长达 1555bp 的启动子[10]。在慢病毒载体介导的临床β-地贫基因治疗试验中，也有研究人员分别使用了 615bp 和 265bp 的启动子进行治疗研究[11,12]。早期有学者提出，*β-globin* 转录起始位点上游 260bp 的启动子区域，足以在 MEL 细胞内被诱导分化表达 *β-globin*。有研究表明在 *β-globin* 基因的-550 至 -527 和-302 至 -294 bp 位点存在两个 BP1 蛋白结合位点，对 *β-globin* 的转录表达具有负调控作用[13]。而这两个结合位点均包含在 675bp 启动子范围内。虽然 1700bp 启动子范围内也包含这两个负调控位点，但其远侧序列包含许多公共转录因子结合位点，存在着复杂的蛋白-蛋白相互作用关系并对 *β-globin* 基因的表达调控起着作用。在本研究中，含 1.7kb 启动子的 pro-1700 和含 265bp 启动子以及对 *β-globin* 基因的 II 号内含子进行了部分删除的 pro-265 拟病毒载体，在 K562 细胞中表达 *β-globin* 基因水平均较高但差异不大，而含 675bp 启动子的 II 号内含子进行部分删除的 pro-675 则表达水平较低。这与已有研究结果基本一致。Philippe Leboulch 等人研究表明对 *β-globin* 基因的 II 号内含子进行部分删

除，可以大大提高慢病毒载体的整合稳定性和病毒制备滴度，同时对β-*globin*基因的表达并没有显著的影响[14]。II号内含子经部分删除后的优化慢病毒载体FCB-P675和FCB-P675，其包装慢病毒颗粒数，与未插入任何基因的原始慢病毒载体滴度，基本无显著差异，与已有研究结果呈一致性。目前，尚未有研究表明此种安全性自删除的慢病毒载体对iPS细胞的感染和整合的有效性，本文首次用自删除的安全性FCB-P265载体包装慢病毒载体，成功地感染了iPS细胞，建立了功能性代偿的iPS细胞系，并制备了嵌合体模型小鼠。在嵌合体模型小鼠中同时检测到了正常剪切和异常剪切的β-*globin*基因转录本的表达；其嵌合体血涂片细胞呈典型的双凹圆盘状、正常色素性红细胞形态，没有发现如654地贫小鼠血像中所含有的异形细胞，形态学接近于WT小鼠。说明嵌合体小鼠可成功表达人正常gloin基因，虽然RT-PCR结果显示不足以完全修正异常剪切转录本，但慢病毒载体的导入确可削弱异常剪切转录本的表达，同时使地中海贫血来源的iPS细胞在小鼠体内分化形成的红细胞质量得到了提升，接近正常小鼠红细胞。后续计划将进一步进行β-*globin*基因启动子增强子的插入以优化载体，进而完全消除异常剪切转录本的表达。

本文构建了不同长度的启动子的自删除β-*globin*基因的慢病毒载体，并根据其自删除后的情况分别构建了拟病毒载体，分析了不同的启动子长度的拟病毒载体的β-*globin*基因在K562细胞中的表达情况的差异，实现了对已有的自删除慢病毒载体的优化；同时，证实了所构建的自删除慢病毒载体能够有效包装成慢病毒假病毒，感染并整合入β-地贫iPS细胞。由转β-*globin*基因的β-地贫iPS细胞所制备的嵌合体模型小鼠的血细胞，其mRNA水平及形态学的分析表明了有正常剪切的β-*globin*基因的表达。此研究为自删除慢病毒载体干细胞治疗的研究及应用提供了参考。

参考文献

[1] Dreuzy ED, Bhukhai K, Leboulch P, et al. Current and future alternative therapies for beta-thalassemia major[J]. Biomedical Journal, 2016, 39(1): 24-38.

[2] 曾溢滔. 人类血红蛋白[M].北京: 科学出版社, 2002:162-170
Zeng Yitao. Human Hemoglobin[M].Beijing: Science Press, 2002:162-170

[3] Dong A, Breda L, Rivella S. Chapter 12 - Gene Therapy for Hemoglobinopathies: Progress and Challenges[M]// Translating Gene Therapy to the Clinic. Elsevier Inc. 2015:191-206.

[4] Chang AH, Sadelain M. The genetic engineering of hematopoietic stem cells: the rise of

lentiviral vectors, the conundrum of the ltr, and the promise of lineage-restricted vectors[J]. Mol Ther, 2007, 15(3): 445-456.

[5] May C, Rivella S, Callegari J, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin[J]. Nature, 2000, 406(6791): 82-86.

[6] Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β-thalassaemia[J]. Nature, 2010, 467(7313): 318-322.

[7] Mansilla-Soto J, Riviere I, Boulad F, et al. Cell and Gene Therapy for the Beta-Thalassemias: Advances and Prospects[J]. Hum Gene Ther, 2016, 27(4): 295-304.

[8] Cesana D, Sgualdino J, Rudilosso L, et al. Whole transcriptome characterization of aberrant splicing events induced by lentiviral vector integrations[J]. J Clin Invest, 2012, 122(5): 1667-1676.

[9] Fang Y, Gong X, Xu M, et al. A self-deletion lentiviral vector to reduce the risk of replication-competent virus formation[J]. J Gene Med, 2013, 15(2): 102-112.

[10] Pasceri P, Pannell D, Xiumei WU, et al. 5′HS1 and the Distal *β-globin* Promoter Functionally Interact in Single Copy *β-globin* Transgenic Mice[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1998, 850(1): 377–381.

[11] Boulad F, Wang X, Qu J, et al. Safe mobilization of CD34+ cells in adults with β-thalassemia and validation of effective globin gene transfer for clinical investigation[J]. Blood, 2014, 123(10): 1483-1486.

[12] Negre O, Bartholomae C, Beuzard Y, et al. Preclinical Evaluation of Efficacy and Safety of an Improved Lentiviral Vector for the Treatment of β-Thalassemia and Sickle Cell Disease[J]. Current Gene Therapy, 2015, 15(1):64-81.

[13] Berg P E, Williams D M, Qian R L, et al. A common protein binds to two silencers 5′ to the human *β-globin* gene[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(21):8833-8852.

[14] Leboulch P, Huang G M, Humphries R K, et al. Mutagenesis of retroviral vectors transducing human beta-globin gene and beta-globin locus control region derivatives results in stable transmission of an active transcriptional structure.[J]. Embo Journal, 1994, 13(13):3065-3076.